



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS

CAMPUS DE CERRO LARGO

CURSO DE AGRONOMIA

HISLLEY CAMPOS SOARES BUBANZ

**POTENCIAL DE RIZOBACTÉRIAS PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL**

CERRO LARGO

2018

HISLLEY CAMPOS SOARES BUBANZ

**POTENCIAL DE RIZOBACTÉRIAS PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado
como requisito para obtenção de grau de Bacharel em
Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Professor Dr. Daniel Joner Daroit

Coorientadora: Professora Dra. Juliane Ludwig

CERRO LARGO

2018

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Bubanz, Hislley Campos Soares
Potencial de rizobactérias para a promoção de
crescimento vegetal / Hislley Campos Soares Bubanz. --
2018.
42 f.:il.

Orientador: Doutor Daniel Joner Daroit.
Co-orientadora: Doutora Juliane Ludwig.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Agronomia, Cerro Largo, RS , 2018.

1. Microrganismos. 2. Rizosfera. 3. Fitormônios. 4.
Fixação biológica de nitrogênio. 5. Solubilização de
fosfato. I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. Ludwig,
Juliane, co-orient. III. Universidade Federal da
Fronteira Sul. IV. Título.

HISLLEY CAMPOS SOARES BUBANZ

**POTENCIAL DE RIZOBACTÉRIAS PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado
como requisito para obtenção de grau de Bacharel em
Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Professor Dr. Daniel Joner Daroit

Coorientadora: Professora Dra. Juliane Ludwig

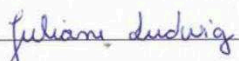
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

04.12.2018

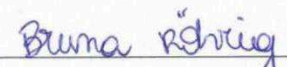
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS
Orientador



Profa. Dra. Juliane Ludwig – UFFS
Coorientadora



Engª. Agrª. Bruna Rohrig

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades concedidas, pela sabedoria e orientação em momentos decisivos. E por todas as graças recebidas ao longo de minha jornada acadêmica.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Joner Daroit, pelo direcionamento nos trabalhos realizados, paciência e disponibilidade em sanar dúvidas. E por todo o incentivo e confiança ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A minha coorientadora, Dra. Juliane Ludwig, por todo o apoio no desenvolvimento deste e de outros trabalhos realizados. Agradeço também, pela oportunidade e orientação quando bolsista de iniciação científica. Oportunidade, a qual contribuiu em meu desenvolvimento e gosto pela fitopatologia.

A prof. Dra. Debora Betemps, pela oportunidade e confiança, sendo minha primeira orientadora em projetos de iniciação científica. Possibilitando-me os primeiros contatos com a pesquisa científica e mostrando-me a importância da pesquisa para o desenvolvimento acadêmico.

Agradeço ainda a todos os professores da Universidade Federal da Fronteira Sul, que de algum modo tenham contribuído em meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A Bruna Rohrig, pela concessão dos microrganismos utilizados nas avaliações.

Aos meus amigos Rodrigo Ferraz Ramos, e Roberto Pavanelo, pela ajuda nas execuções dos trabalhos. E demais amigos de graduação (“Alemão”, Amanda Garcez, Bruno Penedo, Cleiton Hanus, Cleiton Heckler, Felix Cardoso, Lucas da Cruz, Lucas Oliveira, João “Xafaris”).

De modo especial, agradeço a minha família pelo apoio, carinho, compreensão, e, principalmente por me ajudarem na superação das dificuldades nesta trajetória. Muita gratidão a vocês (Edilva Campos Soares Bubanz, Claudir Luiz Bubanz, Dyeovanni Campos Soares Bubanz). Assim também, a minha namorada, Bianca Thomas Scherer, por todo apoio, incentivo e paciência.

Ao meu avô, Osmar Djalma Campos “in memoriam”, pelo exemplo de vida íntegra, sábia e comprometida com a família.

Aos meus amigos de ap. (Adrik, “Brisa”, “Junim”, “Mateuzim”, “Rato”, “Vovô”, Welter, William “Migüê”), por todos os momentos vividos, os quais certamente ficaram marcados por toda a nossa vida.

“As pessoas viajam para admirar a altura das montanhas, as imensas ondas dos mares, o longo percurso dos rios, o vasto domínio do oceano, o movimento circular das estrelas, e, no entanto, elas passam por si mesmas sem se admirarem” (SANTO AGOSTINHO).

RESUMO

A rizosfera, região do solo sob influência direta das raízes, possui abundante proliferação de microrganismos, que agem diretamente sobre as plantas de modo benéfico ou não. Tais microrganismos podem exercer importante influência sobre a produtividade agrícola. Dentre os microrganismos que habitam esta região, estão as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR). Estas são capazes de colonizar o sistema radicular das plantas, beneficiando-as através de diferentes mecanismos. A partir disso, este trabalho objetivou avaliar rizobactérias isoladas da rizosfera do feijão (nomeadas como RD06, RD10, RD12, RD27, RD34 e SD18), quanto a características que apontem para a capacidade de promover o crescimento de plantas. Para tanto, foram executadas avaliações do potencial bacteriano de colonização radicular, da capacidade de produção de fitormônios (giberelina, citocinina, ácido indol acético), fixação assimbiótica de nitrogênio e solubilização de fosfato inorgânico. Os resultados demonstraram que todos os isolados avaliados apresentaram capacidade de colonização da rizosfera do feijão. Em relação à produção de fitormônios, constatou-se a produção de giberelina apenas para os isolados RD10 e RD27. Os resultados para os isolados RD27 e RD34 sugerem a capacidade de produção de citocininas. Quanto ao ácido indol acético, nenhum isolado bacteriano demonstrou produzir este fitormônio pelos métodos empregados. Resultado semelhante foi observado para a solubilização de fosfato inorgânico, onde nenhum dos isolados apresentou essa característica. Todos os isolados avaliados apresentaram crescimento em meios sólidos e semissólidos livres de nitrogênio, indicando a potencial capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. De modo geral, as rizobactérias demonstraram diferentes mecanismos que apontam para o potencial de promoção de crescimento de plantas.

Palavras-chave: Microrganismos; Rizosfera; Fitormônios; Fixação biológica de nitrogênio; Solubilização de fosfato.

ABSTRACT

Rhizosphere, the zone of soil under direct influence of the roots, sustains an abundant proliferation of microorganisms, which act directly on the plants in a beneficial way or otherwise. Such microorganisms might present an important influence on agricultural productivity. Among the microorganisms inhabiting this zone are the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs). They are able to colonize the root system of plants, benefiting them through different mechanisms. Hence, this work aimed to evaluate rhizobacteria (named RD06, RD10, RD12, RD27, RD34 and SD18), previously isolated from bean rhizosphere, regarding their plant growth-promoting traits. Therefore, the bacterial potential for root colonization, the ability to produce phytohormones (gibberellin, cytokinin, indole acetic acid), asymbiotic nitrogen fixation, and inorganic phosphate solubilization, were evaluated. The results showed that all of the evaluated isolates had the ability to colonize the bean rhizosphere. As for phytohormones, gibberellin production was observed for isolates RD10 and RD27. Results for the RD27 and RD34 isolates suggest their ability to produce cytokinins. As for indole acetic acid, none of the bacterial isolates was demonstrated to produce this phytohormone through the methods employed. A similar result was observed for the solubilization of inorganic phosphate, where none of the isolates displayed this feature. All bacterial isolates presented the ability to grow on nitrogen-free solid and semi-solid media, indicating the potential capacity for atmospheric nitrogen fixation. In general, the rhizobacteria have demonstrated different mechanisms that point to the potential of plant growth promoting.

Keywords: Microorganisms; Rhizosphere; Phytohormones; Biological nitrogen fixation; Solubilization of inorganic phosphate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colonização do colo e sistema radicular por rizobactérias. Isolado RD10 (A), RD12 (B), RD06 (C), RD27 (D), RD34 (E) e SD18 (F).	28
Figura 2. Produção potencial de giberelinas por rizobactérias, avaliada através do comprimento de hipocótilo (mm) de rabanete (<i>Raphanus sativus</i> L.).	29
Figura 3. Produção potencial de citocinina por rizobactérias, avaliada através da massa de cotilédones (mg) de rabanete (<i>Raphanus sativus</i> L.).	30
Figura 4. Visualização da presença de película característica de microrganismos diazotróficos em meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono. Os isolados estão representados pelas letras, sendo o isolado RD06 (A), RD10 (B), RD12 (C), RD27 (D), RD34 (E) e SD18 (F).	32
Figura 5. Visualização da presença de película característica de microrganismos diazotróficos, em meio de cultura contendo ácido málico como fonte de carbono.	32
Figura 6. Visualização da presença de película característica de microrganismos diazotróficos, em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono. Os isolados estão representados pelas letras RD06 (A), RD34 (B), SD18 (C).	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Presença (+), ausência (-) ou colonização parcial (+/-) do sistema radicular e da região do colo do feijão, in vitro.	28
Tabela 2. Presença (+) ou ausência (-) de película em meio semissólido livre de nitrogênio contendo diferentes fontes de carbono.	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 MICROBIOTA DO SOLO	13
2.2 RIZOBACTÉRIAS	14
2.3 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	15
2.3.1 Colonização radicular por rizobactérias.....	16
2.3.2 Produção de fitormônios.....	17
2.3.3 Solubilização de fosfatos	18
2.3.4 Fixação biológica de nitrogênio.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 RIZOBACTÉRIAS AVALIADAS.....	22
3.2 AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO RADICULAR EM MUDAS DE FEIJÃO.....	22
3.3 AVALIAÇÃO DE PRODUÇÃO DE CITOCININAS E GIBERELINAS	23
3.4 FIXAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO	23
3.5 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO	25
3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 COLONIZAÇÃO RADICULAR	27
4.2 PRODUÇÃO DE CITOCININAS E GIBERELINAS	29
4.3 FIXAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO	30
4.4 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO	33
4.5 PRODUÇÃO DE AIA	34
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A artificialização dos ecossistemas para a implantação dos cultivos agrícolas, baseia-se no uso intensivo de insumos externos, como fertilizantes sintéticos, agrotóxicos, entre outros (RESTREPO et al., 2000). Esse modelo contribuiu para o aumento significativo da produção de alimentos. Entretanto, o uso demasiado de agroquímicos e fertilizantes sintéticos pode acarretar a redução da biodiversidade do solo e problemas severos em relação a saúde e ao meio ambiente. Além disso, a dependência por insumos acaba elevando os custos de produção e, consequentemente, à redução nas margens de lucro dos produtores (RESTREPO et al., 2000; SOTTERO, 2003; ARIAS et al., 2005).

A partir dessas observações, a discussão acerca da sustentabilidade na agricultura alerta sobre o desgaste dos recursos naturais provocados pelo modelo agrícola convencional. Tal discussão vem contribuindo para a criação do consenso acerca da necessidade de direcionar a agricultura convencional para um enfoque mais sustentável (ALTIERI, 2004). Neste contexto, o solo é considerado o recurso natural mais importante e explorado pela agricultura, cumprindo funções amplas e fundamentais nos agroecossistemas. Segundo Vezzani e Mielniczuk (2009), as funções do solo compreendem os processos de fluxo de água no ambiente, nos ciclos biogeoquímicos, na estocagem de elementos, além de outras. Sendo a biota do solo, fundamental para manutenção da qualidade do mesmo, devido sua participação em diversos processos bioquímicos que ocorrem ali (ARIAS et al., 2005; VEZZANI e MIELNICZUK, 2009).

É sabido que boa parte da biodiversidade presente no solo é composta pelos microrganismos, e que estes são responsáveis pelos processos de transformações orgânicas e inorgânicas, influenciando diretamente a fertilidade do solo e a capacidade produtiva do mesmo (ALTIERI, 1999; SOTTERO, 2003). Os benefícios promovidos pelos microrganismos do solo à produção agrícola, estão ligados a mineralização de compostos orgânicos, disponibilizando nutrientes como nitrogênio, fósforo, enxofre e outros para a solução do solo, assim como, a fixação biológica de nitrogênio, controle biológico de patógenos, produção de fitormônios (ARIAS et al., 2005).

A partir dessa perspectiva, uma alternativa tecnológica capaz de contribuir para o aumento da produtividade agrícola, e em contrapartida reduzir os impactos negativos ao meio ambiente, bem como diminuir os custos de produção devido à menor necessidade em aplicação

de insumos químicos, baseia-se na utilização de microrganismos promotores de crescimento vegetal (SOTTERO, 2003; MONTALDO, 2016). Dentre estes, destaca-se o grupo das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR), que já tiveram seu potencial avaliado em diferentes culturas (FREITAS & VILDOSO, 2004; TEIXEIRA et al., 2005; LUCON, 2008; SHAHAB et al., 2009).

Rohrig (2016), em seu trabalho utilizando isolados da rizosfera e rizoplane de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), buscou selecionar potenciais agentes de biocontrole dos fitopatógenos habitantes do solo, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. A partir disso, selecionaram-se seis isolados que demonstraram respostas positivas para características desejáveis em PGPR como, antibiose, produção de sideróforos e produção de amônia. Desta forma, estes microrganismos podem apresentar potencial como promotoras de crescimento de plantas.

A partir disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, rizobactérias pré-isoladas da rizosfera do feijão quanto a características que apontem para o potencial como agentes de promoção de crescimento de plantas. De forma específica, buscou-se investigar o potencial bacteriano de colonização radicular; avaliar a capacidade de produção de fitormônios [ácido indol acético (AIA), citocininas e giberelinas]; indicar a habilidade de solubilização de fosfato inorgânico; averiguar o potencial de fixação assimbiótica de nitrogênio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROBIOTA DO SOLO

As relações heterogêneas existentes no solo permitem que organismos distintos uns dos outros possam sobreviver no mesmo habitat, interagindo entre si, às vezes com elevados graus de dependência, havendo equilíbrio entre a biodiversidade presente. Além de organismos distintos desempenharem várias funções, a biodiversidade presente no solo proporciona a redundância funcional que, em síntese, é a capacidade de diferentes organismos em executar a mesma função, o que beneficia a estabilidade do ecossistema (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A microbiota do solo compreende parte da fração biológica do solo, e é composta por grupos de organismos que incluem algas, bactérias, fungos, protozoários e vírus (ARAÚJO e HUNGRIA, 1994; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Esses microrganismos são responsáveis por inúmeros processos bioquímicos no solo que são de grande importância agrônômica, tais como: decomposição de matéria orgânica resultando na liberação de CO₂ à atmosfera e nutrientes às plantas; processos que garantem o fluxo de energia e nutrientes no sistema solo-planta. A mineralização de compostos orgânicos, a fixação biológica de nitrogênio, transformações bioquímicas por processos de nitrificação, desnitrificação, oxidação e redução de enxofre, atuam na ciclagem de nutrientes. Ainda, a microbiota participa da decomposição de poluentes e na produção de metabólitos microbianos, como hormônios, sideróforos, antibióticos, entre outros, pode promover o crescimento de plantas (ARAÚJO e HUNGRIA, 1994; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; ANDREOLA e FERNANDES, 2007). Além disso, os microrganismos atuam na gênese do solo, através da participação nos processos de intemperismo das rochas (ANDREOLA e FERNANDES, 2007).

Segundo Araújo e Hungria (1994), os resultados de pesquisas com microrganismos possibilitaram compreender a participação destes em processos importantes para a produtividade agrícola, tornando possível a utilização de tecnologias como a inoculação de leguminosas e a micorrização em espécies arbóreas. Desse modo, é fundamental compreender a dinâmica que envolve fatores abióticos e bióticos, assim como a ecologia do solo, para que a introdução de um novo organismo em um ecossistema em equilíbrio seja bem-sucedida.

Dentre os microrganismos presentes no solo, as bactérias representam o grupo mais numeroso, possuindo ampla diversidade funcional (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Tais

microrganismos, participam diretamente na degradação de matéria orgânica e poluentes presentes no solo. Além disso, atuam em diversos processos biogeoquímicos, como a ciclagem de nitrogênio, sendo que há diversos representantes capazes de fixar este elemento presente na atmosfera, disponibilizando-o em sequência para as plantas (EMBRAPA, 2016).

2.2 RIZOBACTÉRIAS

Por definição, a rizosfera é a região do solo sob influência direta das raízes, e se delimita da superfície da mesma até uma distância de alguns milímetros em direção ao solo (SOTTERO, 2003; GRAY e SMITH, 2005), podendo se estender para dentro da epiderme radicular (GRAY e SMITH, 2005). Nessa região, encontra-se uma abundante proliferação de microrganismos devido à liberação de exsudatos radiculares, que servem como uma rica fonte de energia e nutrientes, proporcionando à rizosfera uma maior concentração de bactérias do que em outras partes do solo (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007; GRAY e SMITH, 2005). Entretanto, mesmo com a abundância de microrganismos, não mais que 15% da superfície da raiz é ocupada por células microbianas (GRAY e SMITH, 2005).

Os exsudatos radiculares, além de servirem como substrato para o crescimento de microrganismos, são capazes de influenciar a colonização dos mesmos na rizosfera, selecionando aqueles que são eficientes na utilização de determinados substratos. Desse modo, as populações rizosféricas podem variar dentre espécies de plantas, e entre cultivares, devido aos diferentes exsudatos produzidos (KLOEPPER, 1996; SOTTERO, 2003). Em contrapartida, os microrganismos influenciam nas características dos componentes dos exsudatos, devido à mudança no metabolismo das células radiculares, assim como na nutrição das plantas (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007).

Cardoso e Nogueira (2007) expõem algumas alterações causadas por microrganismos na rizosfera. Segundo os autores, os microrganismos podem afetar a formação, morfologia e estrutura das raízes, modificando o metabolismo, permeabilidade celular, e a produção de exsudatos, além de alterarem a disponibilidade de nutrientes para as plantas, agindo, portanto, benéficamente, prejudicialmente, ou não afetando as plantas.

Dentre os microrganismos que habitam o solo, e que são capazes de interagir com as plantas, destacam-se as rizobactérias, que se localizam na região da rizosfera e são capazes de colonizar o sistema radicular das plantas (KLOEPPER, 1996). As interações positivas com

plantas ocorrem em relações simbióticas e protocooperativas (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007).

Os avanços na compreensão da relação entre microrganismo e planta, permitiram a utilização de alternativas biotecnológicas na melhoria das práticas agrícolas, proporcionando maior crescimento de plantas, aumento na rentabilidade das culturas, e diminuição dos impactos negativos ao meio ambiente relacionados à utilização de agroquímicos (GRAY e SMITH, 2005).

2.3 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), assim denominadas atualmente, foram primeiramente descritas por Kloepper e Schroth (1978). Constituem um vasto e diversificado grupo de bactérias que habitam a região da rizosfera e são capazes de colonizar o sistema radicular das plantas, estimulando o crescimento, controlando patógenos e agindo benéficamente sobre a planta (KLOEPPER, 1996; VESSEY, 2003; FREITAS, 2007; MONTALDO, 2016).

O grau de intimidade na relação entre PGPR e plantas, assim como o modo que colonizam o sistema radicular, influencia a capacidade das PGPR em serem benéficas (VESSEY, 2003; GRAY e SMITH, 2005). Existe, nesta relação, um gradiente de proximidade e intimidade que determina os níveis de complexidade. Segundo Gray e Smith (2005), esse gradiente é categorizado em dois grupos: as PGPR intracelulares que habitam o interior das células radiculares, em estruturas especializadas, produzem nódulos, fixando nitrogênio simbioticamente com plantas. O outro grupo são as PGPR extracelulares, que habitam a região da rizosfera, rizoplane e os espaços entre as células do córtex da raiz. As PGPR do segundo grupo não são capazes de produzir nódulos, porém, podem beneficiar o crescimento de plantas através do aumento na disponibilidade de nutrientes e controle de patógenos, dentre outros.

Diversos são os mecanismos de ação das PGPR sobre as plantas hospedeiras, e a busca para conhecê-los vem aumentando consideravelmente. As PGPR podem beneficiar o crescimento das plantas por mecanismos diretos ou indiretos. Diretamente, quando, por exemplo, as PGPR sintetizam compostos benéficos, como fitormônios, aumentam a capacidade de absorção de nutrientes pela fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos. Por outro lado, a promoção indireta do crescimento de plantas se dá principalmente pelo controle

biológico de fitopatógenos, que por sua vez pode ocorrer por produção de antibióticos, sideróforos, pela indução de resistência e pela competição por sítios e nutrientes com o patógeno na planta (VESSEY, 2003; SOTTERO et al., 2006; FREITAS, 2007).

Entretanto, para Gray e Smith (2005), independentemente do mecanismo de promoção de crescimento desempenhado pelas PGPR, os microrganismos devem primeiro ser capazes de colonizar a rizosfera da planta hospedeira.

2.3.1 Colonização radicular por rizobactérias

O estudo de bactérias isoladas da rizosfera e rizoplane como promotoras de crescimento de plantas é bastante difundido, assim como o uso das mesmas no controle de fitopatógenos do solo (LUCON, 2008). Um dos fatores que contribuem para as rizobactérias agirem benéficamente nas plantas se deve à capacidade de crescerem e colonizarem o sistema radicular, agindo diretamente no sítio de infecção de possíveis patógenos (LUCON, 2008), além de fornecerem diferentes fitormônios, produzirem sideróforos e possuírem diversos outros mecanismos (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007).

Diversos autores apontam para a importância da colonização das raízes e o estabelecimento dos microrganismos na rizosfera para que possa ocorrer interação entre planta e microrganismo, seja essa interação benéfica ou não (JJEMBA e ALEXANDER, 1999; SOTTERO, 2003). A capacidade das bactérias em colonizarem a rizosfera está diretamente associada à existência de diversos exsudatos radiculares, que são responsáveis por selecionar os microrganismos habitantes dessa região (NEHL et al., 1996). Devido a esta relação dos microrganismos com os exsudatos radiculares, além de uma maior quantidade, há também maior diversidade de microrganismos no solo rizosférico (SOTTERO, 2003). As PGPR são capazes de melhorar o desenvolvimento de plantas; entretanto, alguns isolados não conseguem expressar seu potencial como promotores de crescimento, devido à sua diminuída capacidade de colonizar a rizosfera (JJEMBA e ALEXANDER, 1999).

Diversos fatores bióticos e abióticos podem interferir diretamente sobre a colonização radicular, determinando o sucesso no estabelecimento do microrganismo na rizosfera. A utilização de PGPR é diretamente afetada por esses fatores, como os exsudatos vegetais, a microbiota nativa, a capacidade de deslocamento e agressividade do microrganismo inoculado, assim como, o valor do pH, a aeração e porosidade do solo, além da estrutura e a textura do mesmo, dentre outros (SUSLOW, 1982; NEHL et al., 1996; JJEMBA e ALEXANDER, 1999;

FREITAS, 2007). Para Jjemba e Alexander (1999), o sucesso na colonização da rizosfera depende da capacidade dos microrganismos introduzidos sobreviverem em grandes números no solo. Portanto, é necessário que os isolados introduzidos sejam capazes de competir com os microrganismos que já estão presentes no solo e se sobressaiam a eles.

Entende-se, portanto, que para haver uma interação, entre as PGPR e a planta, é essencial a colonização da rizosfera por parte dos isolados introduzidos (SOTTERO, 2003). Frente à complexidade destas relações, Freitas (2007) expõe a problemática na variabilidade dos resultados em pesquisas com PGPR, mesmo em condições experimentais semelhantes para um mesmo isolado, o que dificulta o desenvolvimento de produtos comerciais.

2.3.2 Produção de fitormônios

As citocininas são fitormônios responsáveis por estimular a divisão e diferenciação celular. Podem atuar sobre a planta promovendo o aumento no tamanho das folhas, e consequentemente da área foliar, melhorando a abertura estomática em algumas espécies, o desenvolvimento dos cloroplastos e a acumulação de clorofila, retardando o envelhecimento das plantas e, em associação com auxinas, atuam no controle da dominância apical (DAVIE, 1995; MARCHIORO, 2005; GARCIA, 2006). Podem ser produzidas em embriões e frutos, porém sua produção ocorre principalmente nas raízes, de onde são transportadas para toda a planta pelos vasos do xilema (MARCHIORO, 2005).

As giberelinas promovem alongamento celular e, ao contrário das citocininas, possuem pouca influência sobre o desenvolvimento radicular, porém atuam principalmente sobre o crescimento das hastes e do caule, aumentando a altura das plantas, e no desenvolvimento dos frutos (DAVIES, 1995; MARCHIORO, 2005). São produzidas principalmente nas raízes e brotos foliares (MARCHIORO, 2005) e transportados através do floema e xilema (DAVIES, 1995). As giberelinas e citocininas possuem importante atuação na germinação das sementes (TAIZ e ZEIGER, 2004).

As auxinas são fitormônios que estimulam o crescimento de plantas e podem ser produzidos por microrganismos (DOBBELAERE et al., 1999). Dentre as auxinas presentes na planta, o ácido indol-3-acético (AIA) é a principal. Os efeitos sobre as plantas incluem o alongamento celular, promovendo o crescimento de raízes e caules; entretanto, esse efeito irá depender da concentração do fitormônio, visto que em altas concentrações o alongamento

celular é inibido (DOBBELAERE et al., 2002; MARCHIORO, 2005). Ainda, auxinas participam da divisão celular, diferenciação do floema e xilema, formação de raízes em estacas, dominância apical, tropismo, retardo da senescência foliar, inibição da abscisão de folhas e frutos (DAVIES, 1995; MARCHIORO, 2005). Segundo Marchioro (2005), existem diferentes níveis de sensibilidade às auxinas nas plantas. Neste caso, aponta o autor, as células da raiz são mais sensíveis a esse fitormônio do que as células do caule.

A biossíntese das auxinas, seja em plantas ou em microrganismos, possui como precursor o aminoácido L-triptofano (DAVIES, 1995; KHALID et al., 2004). O AIA produzido por PGPR e liberado para as plantas pode agir benéficamente promovendo o aumento na quantidade de pelos radiculares presentes na raiz, assim como o comprimento dos mesmos. Porém, essa relação entre plantas e PGPR produtoras de AIA, pode ser prejudicial, tendo em vista que em altas concentrações, este fitormônio inibe o alongamento celular (MONTALDO, 2016).

Estes fitormônios (auxinas, giberelinas e citocininas) são considerados como reguladores naturais de crescimento das plantas, estando entre os principais compostos fornecidos pelas PGPR (MARCHIORO, 2005). Desse modo, auxiliam no crescimento radicular e da parte aérea, melhorando, portanto, o contato e a absorção de nutrientes e água do solo, tolerância a estresses abióticos, aumento na área foliar, dentre outros benefícios (DAVIE, 1995). Dobbelaere et al. (1999) indicam que a utilização de microrganismos produtores de fitormônios nem sempre é benéfica para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Os autores observaram que, à medida em que houve aumento do número de células bacterianas viáveis com esta característica na inoculação das plantas, percebeu-se o encurtamento das raízes e a inibição de seu crescimento. Sendo este fenômeno atribuído ao excesso do fitormônio produzido.

2.3.3 Solubilização de fosfatos

Dentre os macronutrientes, o fósforo (P) é considerado como o segundo nutriente mais limitante para o crescimento e desenvolvimento de plantas (KUSS, 2006; MONTALDO, 2016). Este nutriente encontra-se em baixa disponibilidade para as plantas na grande maioria dos solos, em especial aqueles com pH ácido e com altos teores de ferro e alumínio. Embora o teor de fósforo total nos solos seja, em grande maioria, elevado, a maior parte desse fósforo não está

disponível. A disponibilidade de fósforo está relacionada com as características do solo, a fonte de fosfato e particularidades das espécies vegetais (BRAGA, 2006).

Outra problemática é a baixa eficiência na adubação fosfatada, realizada utilizando principalmente, fosfatos solúveis, que são pouco aproveitados pelas plantas. Desse modo, para suprir a demanda de P necessário para a cultura alcançar elevada produtividade, se faz necessário a aplicação de altas doses de fertilizantes fosfatados, pois a maior parte não estará disponível para a planta (WHITELAW et al. 1999; MONTALDO, 2016). Chabot et al. (1993) expõem que até 75% do fosfato aplicado pode se tornar indisponível para as plantas, devido à ligação com o alumínio, ferro e cálcio. A alta afinidade do fósforo por estes elementos resulta no fenômeno denominado de fixação, que consiste na transformação do fósforo lábil em fósforo não lábil (SOUSA, 2012).

Alguns microrganismos do solo são capazes de atuar sobre o fósforo que está em formas indisponíveis para as plantas, interferindo na disponibilidade deste nutriente no meio. Isso pode ocorrer por processos de mineralização de P orgânico, através da produção de enzimas denominadas fosfatases (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), ou por solubilização de fosfatos inorgânicos, através da liberação de H^+ (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999). A produção de ácidos orgânicos, pode interferir no pH da rizosfera, formar quelatos de íons metálicos e formar complexos solúveis com Ca^{2+} , Al^{3+} , e Fe^{3+} , associados ao fósforo insolúvel (WHITELAW et al., 1999). Desta forma, microrganismos capazes de solubilizar fosfatos podem aumentar a eficiência na adubação e utilização dos fosfatos naturais do solo, beneficiando as culturas e diminuindo os custos de produção.

Os microrganismos solubilizadores de fosfatos cumprem um papel importante para o aumento na disponibilidade de fósforo na solução do solo. Entretanto, a quantidade de fósforo liberado pela população nativa da rizosfera não é satisfatória para a promoção de crescimento significativo das plantas, uma vez que a população de microrganismos que são capazes de solubilizar fosfato, em condições naturais, não é suficiente para competir com os demais microrganismos presentes na rizosfera. Sendo assim, há estratégias de manejo para otimizar a ação desses microrganismos. Deste modo, o manejo populacional de microrganismos que possuem a capacidade de solubilizar fosfato no solo, assim como a utilização de inoculantes microbianos específicos, são estratégias apontadas por diversos autores para melhorar a eficiência da adubação fosfatada, assim como, na absorção deste nutriente pelas plantas (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; RICHARDSON, 2001; BALOTA, 2017).

2.3.4 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é o macronutriente mais limitante no crescimento vegetal. A importância desse nutriente para as plantas é devido à sua fundamental participação na síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos e enzimas, que são essenciais para a vida das plantas (LINDEMANN e GLOVER, 2003; KUSS, 2006). Apesar da alta concentração de nitrogênio na atmosfera (aproximadamente 80%), a grande maioria dos organismos vivos não é capaz de utilizar essa fonte de nitrogênio (N_2 , gasoso). Deste modo, mesmo com grande abundância desse nutriente no ambiente, as plantas podem morrer por sua deficiência (LINDEMANN e GLOVER, 2003).

As principais fontes deste elemento utilizadas pela agricultura são os fertilizantes nitrogenados. Porém, alguns microrganismos, através da decomposição da matéria orgânica do solo e da fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), também são capazes de disponibilizar nitrogênio em forma útil para as plantas (KUSS, 2006). Aqueles microrganismos capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2), transformando-o em amônia (NH_3) através da ação do complexo enzimático denominado nitrogenase, são denominados diazotróficos (BISHOP e PREMAKUMAR, 1992).

A partir dessa perspectiva, os microrganismos que são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico possuem grande participação na disponibilização desse nutriente para a absorção pelas plantas (LINDEMANN e GLOVER, 2003). No entanto, a eficiência na FBN depende da relação entre microrganismo e planta. Nesse caso, algumas plantas são supridas com toda sua necessidade de nitrogênio através da FBN. Por outro lado, parte das culturas agrícolas necessita da aplicação de fertilizantes nitrogenados para suprir a demanda deste elemento (LINDEMANN e GLOVER, 2003).

Os microrganismos diazotróficos podem ser associados ou de vida livre, no que se refere à relação com a planta (KUSS, 2006). No primeiro caso, existe uma associação benéfica entre a planta e o microrganismo, a exemplo da relação simbiótica entre *Rhizobium* spp. e leguminosas, em que há a formação de nódulos nas raízes e o fornecimento de nitrogênio pelas bactérias diretamente para a planta. Já os diazotróficos de vida livre usualmente fixam o nitrogênio em sua biomassa. Posteriormente, com a morte e mineralização da biomassa microbiana, o nitrogênio é liberado para o meio e fica disponível para as plantas (LINDEMANN e GLOVER, 2003). Para Dobbelaere (2003), o fornecimento do nitrogênio

fixado por diazotróficos de vida livre, ao contrário dos microrganismos simbióticos, pode ser baixo devido à não excreção de N de suas células para as plantas, sendo o N apenas liberado após a morte do microrganismo.

Dobereiner et al. (1995) destacam diversas espécies de bactérias diazotróficas presentes na rizosfera e rizoplane. Dentre estas estão representantes dos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter* e *Herbaspirillum*. No entanto, os autores evidenciam a grande diversidade da microbiota dos solos tropicais e, conseqüentemente, a existência de inúmeras bactérias diazotróficas ainda desconhecidas.

Essa capacidade, em interação com as culturas agrícolas, pode promover aumento na produtividade, diminuir a necessidade na aplicação de fertilizantes nitrogenados, contribuindo para melhor utilização dos recursos naturais e reduzindo os custos de produção (KUSS, 2006). Sendo assim, representam importante ferramenta biotecnológica capaz de contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 RIZOBACTÉRIAS AVALIADAS

As rizobactérias utilizadas neste trabalho foram pré-selecionadas em trabalho anterior desenvolvido com feijoeiro (ROHRIG; 2016). Os isolados bacterianos receberam a seguinte catalogação e estão em fase de identificação: RD06, RD10, RD12, RD27, RD34 e SD18. As iniciais RD indicam os isolados provenientes do rizoplane, enquanto as iniciais SD indicam os isolados provenientes da rizosfera.

3.2 AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO RADICULAR EM MUDAS DE FEIJÃO

Na avaliação da colonização radicular foram utilizadas metodologias adaptadas de Silva et al. (2003) e Queiroz et al. (2006). Sementes de feijão foram desinfetadas pela imersão em álcool (70%), por 30 segundos, seguido da imersão em hipoclorito de sódio (2%) por 15 segundos e lavagem com água estéril para remoção de resíduos dos desinfetantes.

Para a microbiolização das sementes, cada um dos isolados foi repicado para placas de Petri contendo meio Ágar-Nutriente (AN) e, após 24 h de crescimento, foi preparada suspensão de cada isolado, separadamente, utilizando solução salina estéril (0,85% NaCl). A suspensão bacteriana de cada isolado foi padronizada em espectrofotômetro ($Abs_{540} = 0,5$). As sementes permaneceram imersas nessa suspensão durante 3 h a 27 °C sob agitação de 100 rpm. Sementes imersas em solução salina estéril foram utilizadas como testemunha.

Após a microbiolização, cada semente foi depositada em tubo de ensaio contendo Ágar-Água (AA) (0,8%) estéril, com aproximadamente 2/3 da altura do tubo e vedado com tampões de algodão. Os tubos foram colocados em posição vertical em estufa tipo BOD, com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25 °C, por até 10 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições para cada tratamento.

As avaliações ocorreram diariamente, examinando os tubos visualmente contra a luz natural. A colonização da raiz foi constatada pela existência de uma zona turba, de aspecto leitoso, ao redor das raízes. Os resultados foram considerados positivos quando verificada a colonização em quatro ou cinco tubos; colonização parcial, quando houve colonização em dois ou três tubos; e negativa quando não houve colonização em quatro ou cinco tubos (SOTERO et al., 2006).

3.3 AVALIAÇÃO DE PRODUÇÃO DE CITOCININAS E GIBERELINAS

O método para avaliação da produção de citocininas e giberelinas foi adaptado ao descrito por Letham (1971) e Cattelan (1999), utilizando cotilédones e hipocótilos de rabanete (*Raphanus sativus* L.). As sementes de rabanete foram selecionadas de modo a homogeneizá-las. Para isso, foram passadas em peneira de 2 mm de abertura. A germinação das sementes foi realizada sobre folhas de papel filtro umedecidas, em caixas *gerbox*, e incubadas por 35 h no escuro, em temperatura de 25 °C. Após a germinação, foi destacado o menor cotilédone e separado o hipocótilo.

Os isolados bacterianos foram cultivados em caldo nutriente por 48 h sob agitação constante a 100 rpm. Posteriormente, os meios de cultura foram centrifugados a 12000 g por 10 min, e o sobrenadante obtido foi separado das células através do processo de filtração em filtro bacteriológico (poros com 0,22 µm de diâmetro).

Por tratamento, foram utilizados oito cotilédones com as nervuras em contato com o papel filtro, e oito hipocótilos, uniformizados em 3 mm de comprimento, sendo depositados em placa de petri. O papel filtro foi umedecido com 3 mL de sobrenadante obtido anteriormente, enquanto o tratamento testemunha recebeu apenas caldo nutriente estéril. Após três dias em estufa tipo BOD, submetidos a luz fraca e constante, os cotilédones foram secos com papel absorvente e sua massa mensurada em balança analítica. Os hipocótilos tiveram seu comprimento mensurado (em mm) utilizando paquímetro digital.

Segundo Cattelan (1999), os isolados produtores de citocininas promovem o aumento da massa dos cotilédones, mas não o crescimento dos hipocótilos; já os isolados produtores de giberelinas aumentam tanto a massa dos cotilédones quanto o comprimento dos hipocótilos. As massas dos cotilédones e o comprimento dos hipocótilos foram comparados com o tratamento testemunha, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

3.4 FIXAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO

Segundo Cattelan (1999), o cultivo de microrganismo em meio de cultura livre de nitrogênio pode ser utilizado para a seleção inicial de bactérias diazotróficas. O uso de meio livre de nitrogênio busca simular um ambiente que possibilita isolar espécies de bactérias que são potencialmente capazes de fixar nitrogênio atmosférico. Para que haja crescimento

bacteriano neste meio, as bactérias necessitam de mecanismos específicos que garantam o suprimento de N, como a produção de enzima nitrogenase (DÖBEREINER et al., 1995).

Neste sentido, o meio mineral utilizado foi adaptado de Park et al. (2005) e Kifle e Laing (2016) tendo por composição (g L^{-1}): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g; K_2HPO_4 , 0,2 g; FeSO_4 , 0,005 g; Na_2MoO_4 , 0,002 g; CaCO_3 , 1,0 g; NaCl , 0,1 g; ágar, 15,0 g.

Foram preparados três meios de culturas com variação apenas quanto à fonte de carbonos para o crescimento microbiano. As fontes de carbono (20 g L^{-1}) foram ácido málico, manitol e sacarose (KIFLE e LAING, 2016). O pH dos meios foi ajustado para 7,0 e, posteriormente, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave. A utilização de diferentes fontes de carbono neste tipo de meio, permite o isolamento de microrganismos mais específicos, como podemos citar o uso de sacarose por *Azospirillum amazonense*, manitol por *Burkholderia kururiensis*, e ácido málico por *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 2014). Entretanto, ainda segundo os autores, por mais que estes meios tenham sido desenvolvidos para microrganismos específicos, eles podem ser usados para isolar outros microrganismos que sejam capazes de utilizar as mesmas fontes de carbono. Possibilitando o isolamento e a identificação de novas espécies fixadoras de nitrogênio.

Para o cultivo dos isolados, foram pipetados 15 mL do respectivo meio de cultura por placa de Petri estéril. A inoculação foi por meio de esgotamento, sendo um total de seis repicagens por placa ($n = 6$). Os isolados que cresceram ao longo do período de incubação foram repicados por mais três vezes para o mesmo meio, visando garantir que o crescimento dos microrganismos não se deu em função das reservas de N presente nas células, de modo a comprovar a estabilidade dessa característica (CATTELAN, 1999). As placas repicadas foram incubadas a 28-30 °C, por até 10 dias.

Subsequentemente, os isolados positivos neste teste foram utilizados para produzir suspensões bacterianas em solução salina, que foram calibradas em espectrofotômetro ($\text{Abs}_{600} = 0,1$). Estas suspensões foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura sem nitrogênio, mas com características semissólidas ($1,8 \text{ g L}^{-1}$ de ágar) e adicionado de azul de bromotimol ($0,02 \text{ g L}^{-1}$). Após incubação a 30 °C por até 10 dias, os tubos foram visualizados quanto à presença de película típica abaixo da superfície do meio semissólido (BALDANI et al., 2014).

3.5 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO

Os microrganismos capazes de solubilizar fosfato inorgânico são convencionalmente selecionados utilizando meio de cultura contendo fosfato tricálcico. Dentre os meios de cultura existentes para essa finalidade, foi utilizado o meio Pikovskaya (PVK), de acordo com metodologia adaptada de Nautiyal (1999). O meio PVK é composto por (g L^{-1}): glicose, 10,0 g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5,0 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g; NaCl, 0,2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; KCl, 0,2 g; extrato de levedura, 0,5 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,002 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g; e ágar, 15,0 g.

Os isolados foram inoculados no meio de cultura através de picadas, em triplicata. O teste consiste na seleção dos microrganismos que são capazes de produzir um halo transparente ao redor da colônia, indicando a solubilização do fosfato tricálcico. Após sete dias de incubação a 28 °C, foram realizadas a medição do diâmetro do halo de solubilização e da colônia bacteriana.

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,05$), utilizando *software* específico.

3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)

O método adotado para avaliação da produção de AIA pelas rizobactérias foi o descrito por Catellan (1999). Utilizou-se o meio de cultura ágar triptona de soja (TSA) diluído 10 vezes (1/10 TSA) e acrescentado de ágar (15 g L^{-1}). O meio foi autoclavado e posteriormente enriquecido com L-triptofano (5 mmol L^{-1} ; $1,021 \text{ g L}^{-1}$), visto que este aminoácido é o precursor do AIA. O L-triptofano foi esterilizado através de filtros bacteriológicos (poro de $0,22 \mu\text{m}$).

Os isolados foram inoculados através de picadas, em triplicata, em placas de Petri contendo o referido meio de cultura. Após a inoculação, o meio foi coberto com membrana de nitrocelulose e incubado por 24 h a 28-30 °C. Passado o tempo demandado, as membranas de nitrocelulose foram transferidas para outras placas de Petri e saturadas com solução de Salkowski. As membranas que formam halos avermelhados entre 30 minutos e 2 h, indicam os isolados considerados como produtores de AIA.

Para preparo da solução de Salkowski foi diluído 1 mL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M), em 50 mL de HClO_4 (35%, v v^{-1}). Sendo a solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M) composta por 135,1 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ diluídos em 1000 mL de H_2O destilada.

Foi realizado um segundo teste, onde as bactérias foram inoculadas em caldo nutriente enriquecido com L-triptofano (5 mmol L^{-1} ; $1,021 \text{ g L}^{-1}$), e incubadas em temperatura de 28-30 °C sob agitação constante por 78 h. Após esse período, os meios de cultura foram centrifugados a 12000 g por 10 min para obtenção do sobrenadante. Utilizou-se 2 mL de sobrenadante misturado a duas gotas de ácido ortofosfórico e 4 mL do reagente de Salkowski.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COLONIZAÇÃO RADICULAR

Métodos *in vitro* possuem a vantagem da avaliação célere da capacidade de microrganismos em colonizarem as raízes das plantas, possibilitando assim a seleção de possíveis agentes promotores de crescimento e biocontrole com maior rapidez. Queiroz et al. (2006) constataram a possibilidade de visualizar a colonização radicular através do método empregado. Segundo os autores, o uso de Agar-Água permitiu a observação de rizobactérias que possuem a habilidade de sobreviver utilizando apenas os exsudatos radiculares.

Desse modo, dentre os 6 isolados avaliados foi constatado em sua totalidade a capacidade de colonização da região do colo das raízes do feijão (Figura 1). Para a colonização do sistema radicular, cinco isolados apresentaram resultados positivos (Tabela 1).

O isolado RD10 colonizou parcialmente o sistema radicular, entretanto, apresentou colonização positiva na região do colo. Sugerindo, portanto, que apesar da colonização parcial do sistema radicular, a capacidade desta rizobactéria em colonizar a rizosfera do feijão pode ser considerada positiva. Do mesmo modo, Sottero (2003) observou resultados semelhantes ao avaliar a capacidade de rizobactérias isoladas de diferentes culturas, na colonização das raízes de plântulas de alface. Sendo assim, é possível observar que dentre os isolados testados, existem diferentes preferências de colonização, ou seja, alguns isolados colonizaram preferencialmente a região do colo, e outros colonizaram tanto a região do colo como o sistema radicular.

É importante salientar que a colonização das raízes e o estabelecimento do microrganismo na rizosfera é fundamental para que possa ocorrer interação entre o mesmo e a planta (JJEMBA e ALEXANDER, 1999). Segundo Lucon (2008), a colonização radicular por rizobactérias é capaz de beneficiar as plantas de diversas formas, principalmente, devido a ação direta no sítio de infecção de possíveis patógenos.

Figura 1. Colonização do colo e sistema radicular por rizobactérias. Isolado RD10 (A), RD12 (B), RD06 (C), RD27 (D), RD34 (E) e SD18 (F).

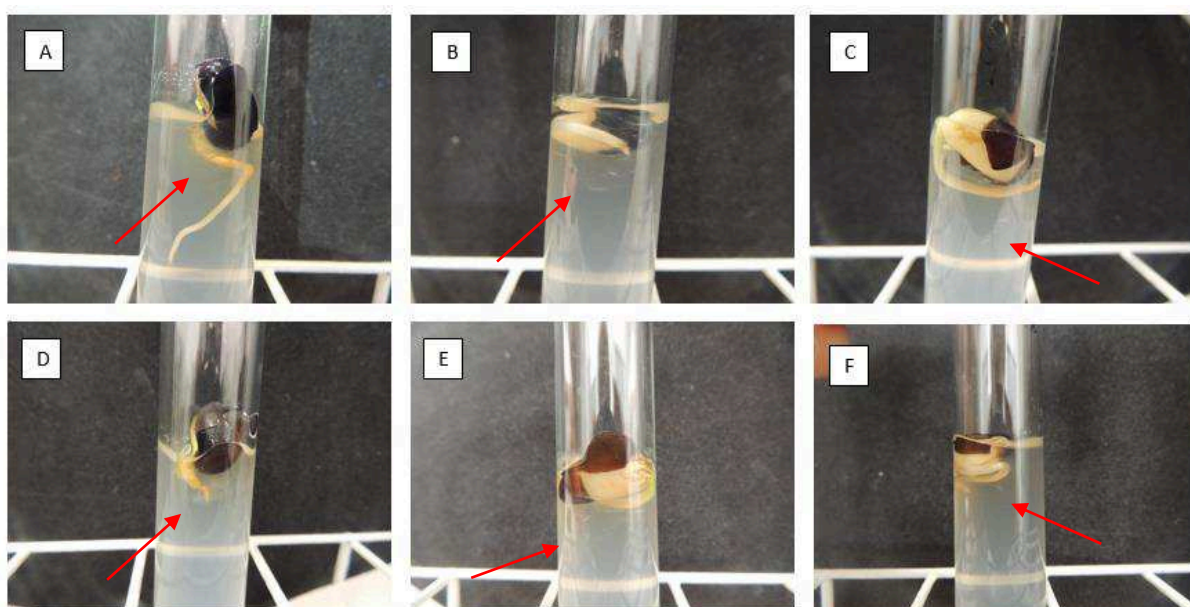


Tabela 1. Presença (+), ausência (-) ou colonização parcial (+/-) do sistema radicular e da região do colo do feijão, *in vitro*.

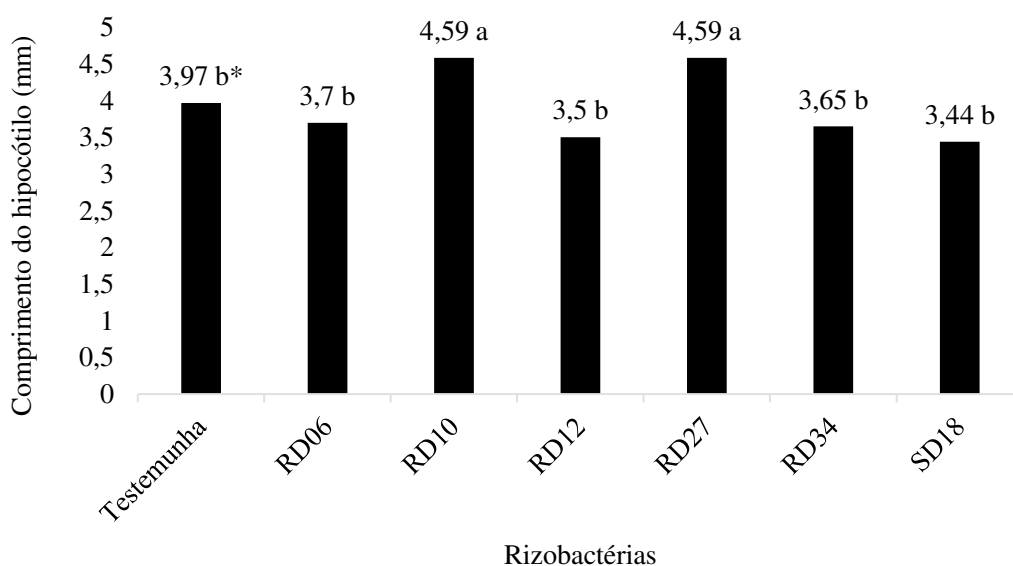
Isolado	Colonização	
	Sistema radicular	Região do colo
Testemunha	-	-
RD06	+	+
RD10	+/-	+
RD12	+	+
RD27	+	+
RD34	+	+
SD18	+	+

4.2 PRODUÇÃO DE CITOCININAS E GIBERELINAS

Através do teste dos cotilédones de Letham (1971), foi possível identificar os isolados capazes de sintetizar os reguladores de crescimento citocininas e giberelinas, pelo aumento dos hipocótilos, assim como pelo ganho no peso dos cotilédones.

Dentre os isolados avaliados, apenas dois isolados (RD10 e RD27) apresentaram diferenças significativas no comprimento do hipocótilo, resultando em aumento de 15,6% em relação a testemunha (Figura 2). O aumento no comprimento do hipocótilo aponta para a capacidade dos isolados em produzirem o hormônio giberelina. Essa relação existe, tendo em vista a ação deste fitormônio no alongamento celular, agindo sobre o crescimento das hastes e do caule, aumentando a altura das plantas, assim como no desenvolvimento dos frutos (DAVIES, 1995; MARCHIORO, 2005).

Figura 2. Produção potencial de giberelinas por rizobactérias, avaliada através do comprimento de hipocótilo (mm) de rabanete (*Raphanus sativus* L.).



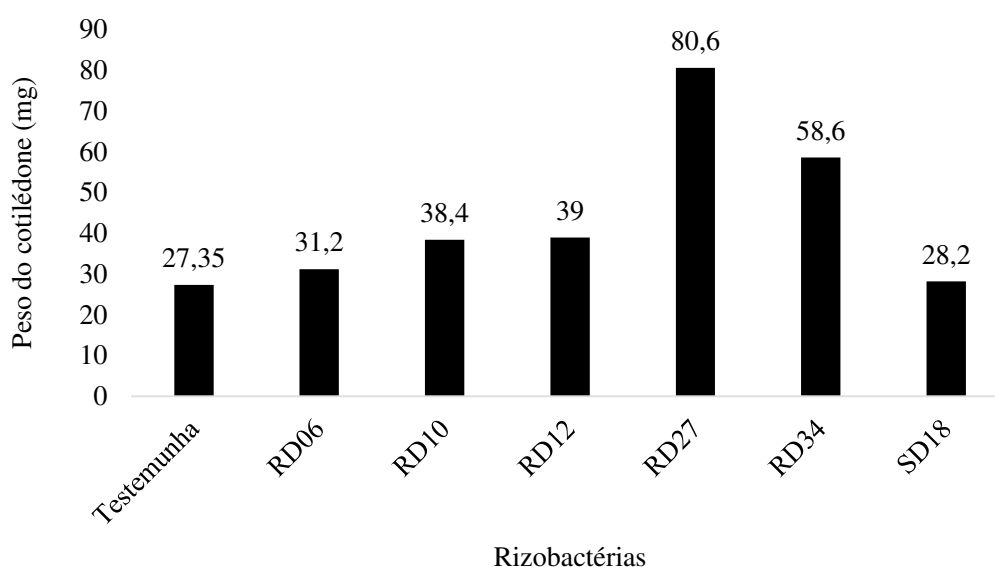
*Médias seguidas pela mesma letra no diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Os resultados obtidos podem caracterizar um possível potencial de produção de citocinina por algumas rizobactérias. Dentre esses isolados destacaram-se o RD 27 e RD 34, cujo peso médio dos cotilédones apresentou contraste em relação ao tratamento testemunha (Figura 3). Entretanto, é necessário salientar que para tal característica não foi realizada análise

estatística, o que impossibilita uma conclusão definitiva sobre este parâmetro. Portanto, são demandados novos testes para que se confirme a tendência apresentada neste trabalho.

Montaldo (2016), em trabalho conduzido com 24 isolados bacterianos, observou a produção de giberelina por 84% dos isolados, enquanto 25% dos isolados apresentaram resultado positivo para a produção de citocinina.

Figura 3. Produção potencial de citocinina por rizobactérias, avaliada através da massa de cotilédones (mg) de rabanete (*Raphanus sativus* L.).



As giberelinas e citocininas possuem importante atuação na germinação das sementes (TAIZ e ZEIGER, 2004). Entretanto, as citocininas ao contrário das giberelinas, são capazes de influenciar no crescimento radicular, e atuam estimulando a divisão e diferenciação celular. Diferentes autores apontam para os benefícios das citocininas sobre as plantas, agindo principalmente sobre o crescimento foliar, promoção do aumento da área foliar, melhoria na abertura estomática em algumas espécies, desenvolvimento dos cloroplastos e a acumulação de clorofila, retardando o envelhecimento das plantas (DAVIE, 1995; MARCHIORO, 2005; GARCIA, 2006).

4.3 FIXAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO

Através dos testes realizados, todos os isolados bacterianos avaliados foram capazes de crescer ao longo de três cultivos sucessivos realizados em meio sólido livre de nitrogênio. Estes

cultivos buscavam eliminar a chance de os isolados estarem crescendo devido ao residual de nitrogênio que poderia conter em suas células, provenientes dos repiques anteriores.

Como descrito por Baldani et al. (2014), após as repicagens em meio sólido os isolados foram repicados para meios semissólidos livres de nitrogênio. Esta etapa foi realizada como método de verificação da capacidade em fixar nitrogênio atmosférico, através da presença de uma película característica para organismo diazotróficos. O uso de meio semissólidos para a identificação de bactérias fixadoras de nitrogênio está correlacionado à sensibilidade do complexo enzimático nitrogenase, responsável pela redução do gás N₂ atmosférico, ao contato com oxigênio. Tendo em vista que o meio semissólido, é capaz de proporcionar tanto um ambiente aeróbico e anaeróbico, este meio, permite que as bactérias se desenvolvam no ambiente mais adequado às suas exigências (BALDANI et al., 2014).

Deste modo, constatou-se que 100% do isolados avaliados apresentaram resultado positivo para a presença de película característica quando inoculados em meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono (Tabela 2; Figura 4).

Tabela 2. Presença (+) ou ausência (-) de película em meio semissólido livre de nitrogênio contendo diferentes fontes de carbono.

Isolado	Sacarose	Ácido málico	Manitol
RD06	+	-	+
RD34	+	-	+
RD27	+	+	-
SD18	+	-	+
RD10	+	-	-
RD12	+	-	-

Entretanto, este resultado não se repetiu para todos os isolados quando outras fontes de carbono foram utilizadas. Para o meio contendo ácido málico, apenas os isolados RD27, apresentou a película (Figura 5), demonstrando certa especificidade para os demais isolados, em relação à capacidade de utilizarem diferentes fontes de carbono. Já em relação ao meio contendo manitol, os isolados RD34, RD06 e SD18 foram capazes de desenvolver a película característica (Figura 6), indicando potencial para de fixação de nitrogênio.

Figura 4. Visualização da presença de película característica de microrganismos diazotróficos em meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono. Os isolados estão representados pelas letras, sendo o isolado RD06 (A), RD10 (B), RD12 (C), RD27 (D), RD34 (E) e SD18 (F).

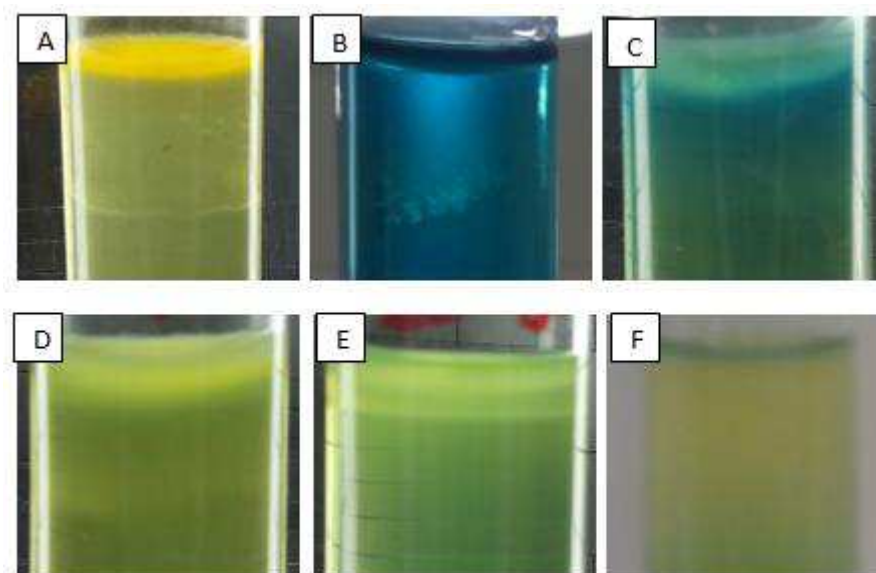
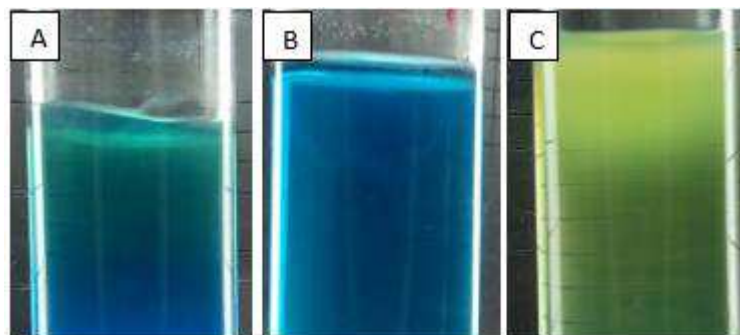


Figura 5. Visualização da presença de película característica de microrganismos diazotróficos, em meio de cultura contendo ácido málico como fonte de carbono.



Figura 6. Visualização da presença de película característica de microrganismos diazotróficos, em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono. Os isolados estão representados pelas letras RD06 (A), RD34 (B), SD18 (C).



A utilização de três meios de cultura, com fontes de carbono distintas, tende a acarretar menor erro em relação à identificação de isolados diazotróficos, tendo em vista a eficiência bacteriana em utilizar uma fonte de carbono específica, aumentando, portanto, a confiabilidade nos resultados obtidos (BALDANI et al., 2014).

De modo geral, todos os isolados avaliados cresceram em meio livre de nitrogênio, sugerindo potencial para a fixação assimbiótica de nitrogênio. O alto número de isolados com esta característica também foi encontrado por Felestrino (2013), sendo 80% dos 81 isolados avaliados pelo autor, classificados como fixadores de nitrogênio.

Do ponto de vista agrônômico, os microrganismos diazotróficos em interação com as culturas agrícolas podem promover melhor desenvolvimento das plantas assim como o aumento na produtividade. Isto ocorre devido a importante participação deste nutriente nos processos fisiológicos das plantas. Além disso, o fornecimento de nitrogênio por estes microrganismos corrobora diretamente para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, graças à menor dependência na utilização de fertilizantes nitrogenados (KUSS, 2006).

4.4 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO

Alguns microrganismos são capazes de interferir na disponibilidade de P no solo. Dentre estes microrganismos, alguns podem ser encontrados na região da rizosfera (GYANESHWAR

et al., 2002). Tais microrganismos agem como solubilizadores de fosfato inorgânico, através da excreção de prótons, produção de ácidos orgânicos e consequente redução do pH, entre outros mecanismos (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999), e/ou na mineralização de P orgânico, pela produção de enzimas fosfatases (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Na avaliação da capacidade de solubilizar fosfato inorgânico pelo método de Pikovskaya, observou-se que não houve a produção do halo claro no meio de cultura pelos isolados avaliados, indicando, portanto, que nas condições de ensaio, os isolados não possuem tal potencial. No entanto, todos os isolados avaliados demonstraram habilidade de crescimento no meio PVK (resultados não mostrados).

Cabe salientar que o fato de os isolados não apresentarem a formação de halos claros no meio de cultura não exclui necessariamente a capacidade dos mesmos em solubilizarem fosfato inorgânico. Este fato é discutido por Nautiyal (1999), que aponta que alguns isolados, mesmo não produzindo halos visíveis, são capazes de solubilizar fosfato inorgânico quando avaliados em meio líquido. Do mesmo modo, Whitelaw (1999) expõe que o tamanho da zona do halo possui baixa correlação com resultados quantitativos da solubilização de P em meio de cultura líquido. Assim, isolados que não apresentam halos quando cultivados em meios sólidos podem, todavia, ser altamente eficientes em solubilizar P em meio líquido.

4.5 PRODUÇÃO DE AIA

Segundo Dobbelaere (2003), a capacidade de sintetizar ácido indol acético, é característica generalizada entre as rizobactérias. Entretanto, os isolados avaliados não foram capazes de produzir o hormônio AIA. Esse fato foi confirmado, pela coloração amarelada apresentada pelos isolados, na presença do reagente de Salkowski, indicando o resultado negativo para os dois métodos utilizados na avaliação.

Nos ensaios realizados, o reagente de Salkowski reage com o AIA produzido pelas bactérias, resultando em uma coloração avermelhada, indicando os isolados positivos para a produção desse fitormônio. Marchioro (2005) expõe que a reação do reagente de Salkowski com o AIA ocorre através da oxidação de compostos indólicos por sais férricos.

Para o teste, de acordo com a metodologia descrita por Cattelan (1999), utilizando membranas de nitrocelulose, é possível observar os pontos de crescimento das rizobactérias

(coloração amarelada). Do mesmo modo, para o teste utilizando o sobrenadante obtido a partir do crescimento das rizobactérias em caldo nutriente enriquecido com L-triptofano, a coloração predominante nos tubos de ensaio foi amarelada.

Resultado diferente a este foi encontrado por Felestrino (2013), em teste semelhante ao de membranas de nitrocelulose, onde o autor reportou resultado positivo para 80% dos isolados. Do mesmo modo, Shahab et al. (2009), trabalhando com metodologia semelhante e utilizando o sobrenadante de cultivos de isolados bacterianos, obtiveram resultados positivos para a produção de AIA por *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Agronomicamente, bactérias produtoras de reguladores de crescimento desempenham um papel importante na promoção de crescimento de plantas (DOBBELAERE, 2003). Em especial, a auxina AIA promove estímulos à planta agindo tanto no alongamento quanto na divisão e diferenciação celular (DOBBELAERE, 2003). Este fitormônio apresenta resultados variados em relação as diferentes culturas, e pode promover o crescimento radicular das plantas quando em concentrações adequadas (DOBBELAERE et al., 1999).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos sugerem que todos os seis isolados bacterianos avaliados apresentaram capacidade de colonização do sistema radicular e/ou colo de plântulas de feijão. Apenas as rizobactérias RD10 e RD27 apresentaram significância para a produção de giberelinas. Já em relação à citocinina, houve uma tendência para os isolados RD27 e RD34, para a produção deste fitormônio. Entretanto esta característica ainda necessita ser validada.

O crescimento bacteriano em meio livre de nitrogênio foi constatado para todos os isolados avaliados. Do mesmo modo, todas as rizobactérias apresentaram a presença de película característica para diazotróficos, quando cultivadas em meio de cultura semissólido. Ressalta-se que os testes realizados são preliminares. Desta forma, recomenda-se que as rizobactérias sejam submetidas a testes confirmatórios da capacidade de fixação de nitrogênio. Além disso, se faz necessário compreender as capacidades de tais microrganismos em fornecer o nitrogênio fixado para as plantas cultivadas.

A ausência de halos claros que circundam as colônias bacterianas em meio de cultura Pikovskaya apontam que as rizobactérias não são eficientes na solubilização de P inorgânico. Entretanto, compreende-se a necessidade de testes adicionais para que se comprove o real potencial destes microrganismos, visto a incapacidade do método utilizado em identificar todos os microrganismos solubilizadores de P.

Em relação a produção de ácido indol acético, compreende-se que pelas técnicas empregadas, os isolados bacterianos avaliados não são capazes de sintetizar AIA a partir do triptofano como aminoácido precursor.

As avaliações *in vitro* realizadas, apontam que tais rizobactérias possuem potencial promissor como agentes de promoção de crescimento de plantas. Evidenciando assim, a importância da identificação e conhecimento acerca da microbiota presente na rizosfera, e de seu potencial em agir benéficamente sobre as culturas agrícolas. Viabilizando assim, o desenvolvimento de futuras biotecnologias para a agricultura.

REFERÊNCIAS

- ALTIERI, M. A. **The ecological role of biodiversity in agroecosystems**. Agriculture, Ecosystems and Environment, v. 74, p. 19–31, 1999.
- ALTIERI, M. A. **Agroecologia: A dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 2^a.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 110, 2004.
- ANDREOLA, F.; FERNANDES, S. A. P. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas. In SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 312 p, 2007.
- ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de importância agrícola**; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão: Centro Nacional de Pesquisa de Soja. - Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.
- ARIAS, M. E.; GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A., GONZÁLEZ-VILA, F. J., & BALL, A. S. **Soil health — a new challenge for microbiologists and chemists**. International Microbiology, v. 8, p. 13-21, 2005.
- BALDANI, J. I., REIS, V. M., VIDEIRA, S. S., BODDEY, L. H., & BALDANI, V. L. D. **The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists**. Plant and soil, v. 384, n. 1-2, p. 413-431, 2014.
- BALOTA, E. L. **Manejo e qualidade biológica do solo**. Londrina: Mecenass, 2017.
- BISHOP, P.E.; PREMAKUMAR, R. Alternative nitrogen fixation systems. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p.736-762, 1992.
- BRAGA, G. **Eficiência de fosfatos com solubilidade variável em água em solos com capacidade de fixação de fósforo induzida**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) -Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, p. 82, 2006.
- CARDOSO, E.J.B.N.; NOGUEIRA, M. A. A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade microbiana e na Nutrição de Plantas. In SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 312 p, 2007.
- CATTELAN, A.J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, p. 36, 1999.
- CHABOT, R; ANTOUN, H; CESCAS, M P. **Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique**. Canadian journal of microbiology, v. 39, n. 10, p. 941-947, 1993.

- DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: **Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology**. DAVIES, P. J. (Ed.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, p. 1-15, 1995.
- DOBBELAERE, S; CROONENBORGH A; THYS A; VANDE BROEK A; VANDERLEYDEN J. **Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat**. Plant Soil, v. 212, n. 2, p.155–164, 1999.
- DOBBELAERE, S, CROONENBORGH A, THYS A, PTACEK D, OKON Y, VANDERLEYDEN J. **Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize**. Biology and Fertility of Soils, v. 36, p. 284–297, 2002.
- DOBBELAERE, S., J. VANDERLEYDEN, AND Y. OKON. **Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere**. Crit. Rev. Plant Sci, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, I.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. - Brasília : EMBRAPA - SPI : Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995.
- EMBRAPA. **Fungos e bactérias fazem plantas crescerem mais**. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/12132485/fungos-e-bacterias-fazem-plantas-crescerem-mais>. Acesso em: 09/12/2018.
- FELESTRINO, E. B. **Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de microrganismo associados à interação *Langsdorffia hypogaea*-hospedeira-rizosfera**. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
- FREITAS, S. S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, p. 10-27, 2007.
- FREITAS, S.S.; VILDOSO, C.I.A. **Rizobactérias e promoção do crescimento e plantas cítricas**. R. Bras. Ci. Solo. 28, 987-994, 2004.
- GARCIA AS, BRANQUINHO EGDA, MENUCHI ACTP, ERLACHER KC, DOMINGUES MCS. **Efeito de reguladores vegetais na germinação e desenvolvimento da semente *Strelitzia reginae***. Thesis São Paulo ano III, 5: 161-176. 2006.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. **Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants**. Plant and Soil, v. 245, p. 83-93, 2002.
- JJEMBA, P.K., ALEXANDER, M. **Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria**. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v. 31, n. 4, p. 623-632, 1999.
- KHALID A, ARSHAD M, ZAHIR ZA. **Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat**. J Appl Microbiol, v. 96, p. 473–480, 2004.

KIFLE, M.H.; LAING, M.D. **Isolation and screening of bacteria for their diazotrophic potential and their influence on growth promotion of maize seedlings in greenhouses.** *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 1225, 2016.

KLOEPPER, J. W. & SCHROTH, M. N. **Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes.** *Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria*, IV, Angus, 1978. *Proceedings*, v. 2. p. 879-882, 1978

KLOEPPER, J.W. **Host specificity in microbe-microbe interactions.** *Bioscience* *Bioscience* *Bioscience* *Bioscience*, v.46, p. 406-409, 1996.

KUSS, A.V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Brazil. 2006.

LETHAM DS. **Regulators of cell division in plant tissues. XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons.** *Physiol Plant* v. 25, p. 391-396, 1971.

LINDEMANN, WC; GLOVER, CR. **Nitrogen fixation by legumes.** New Mexico State Uni. Electronic Distribution May 2003.

LUCON, C.M.M.; AKAMATSU, M.A.; HARAKAVA, R. **Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.43, n.6, p.691-697, 2008.

MARCHIORO, T.E.L. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio.** Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

MONTALDO, Yamina Coentro. **Bioprospecção e isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com características para a promoção de crescimento vegetal.** Tese (Doutorado em Rede Nordeste de Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, p. 101, 2016.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** 2 ed. Lavras: editora UFLA, 2006.

NAUTIYAL C.S. **An efficient microbiological growth medium for screening of phosphate solubilizing microorganisms.** *FEMS Microbiol. Lett*, v. 170, p. 265–270, 1999.

NEHL, D.B.; BROWN, J.F. **Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective.** *Applied Soil Ecology*, v. 5, p. 1-20, 1996.

PARK, M.; KIM, C.; YANG, J.; LEE, H.; SHIN, W.; KIM, S.; SA, T. **Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea.** *Microbiological Research*, v. 160, p. 127-133, 2005.

PELISSARI, G.; CARVALHO, I. R.; SILVA, A. D. B. **Hormônios reguladores de crescimento e seus efeitos sobre os parâmetros morfológicos de gramíneas forrageiras.** Trabalho de Pesquisa desenvolvido na Universidade Federal de Santa Maria Campus Frederico Westphalen-RS, 2012

QUEIROZ, B.P.V.; AGUILAR-VILDOSO, C.; IMELOI, S. Visualização in vitro da colonização por rizobactérias. *Summa Phytopathology*, v. 32, p.95-97. 2006.

RESTREPO, M. J.; ANGEL, S. D.; PRAGER, M. M. Conceptualización y Desarrollo de la Agroecología. in RESTREPO, M. J.; ANGEL, S. D.; PRAGER, M. M. **Agroecología** (pág. 120). Santo Domingo, República Dominicana.: © Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (CEDAF). 2000.

RICHARDSON A. E. **Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants.** *Aust. J. Plant Physiol*, v. 28, p. 897–906. 2001.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R.; **Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion.** *Biotechnol. Adv*, v.17, p. 319–339. 1999.

ROHRIG, B. **Bioprospecção de bactérias, isoladas de diferentes sistemas de cultivo, para o controle de patógenos habitantes de solo da cultura do feijão.** 2016. 50 p. Trabalho de conclusão de cursos - Universidade Federal das Fronteiras Sul, Curso de graduação em Agronomia, Cerro Largo, 2016.

SHAHAB S, AHMED N, KHAN NS: **Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs.** *Af J Agri Res*. 4: 1312-1316, 2009.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S. & MOUNTEER, A. **Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents.** *J. Phytopathol.*, v. 151, p. 42-46, 2003.

TEIXEIRA, D.A., ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., MAFFIA, L.A., FERREIRA, E.M.. **Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.** *Fitopatologia Brasileira* 30, 350–356, 2005.

SOTTERO, A.N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias.** Dissertação de Mestrado, Instituto Agrônomo, Campinas, 2003.

SOTTERO, N.A.et al. **Rizobactérias e alfafa: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, p.225-234. 2006.

SOUSA, C.A. **Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas.** (Dissertação) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SUSLOW, T.V. Role of root colonizing bacteria in plant growth. In: MOUNT, M.S.; LARY, G.H. (Eds.). **Phytopathogenic Prokaryotes.** London: Academic Press, v.2, 1982.

VESSEY, K.V. **Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers.** Plant Soil, v. 255, p. 571–586, 2003.

VEZZANI, F. M., MIELNICZUK, J.. **Uma visão sobre qualidade do solo.** Revista brasileira de ciência do solo. Viçosa. Vol. 33, n. 4 (jul./ago. 2009), p. 743-755, 2009.

WHITELAW, M. A.; HARDEN, T. J.; HELYAR, K. R. **Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*.** Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v. 31, p. 655-665, 1999.